

# Tavuklarda Sellular Savunma Sisteminde Trombocytlerin Rolü

Aytekin ÖZER\*

## ÖZET

*Tavuk trombocyt'leri ince pseudopodlara sahip, oval-yuvarlak biçimli hücrelerdir. Heterochromatik yapıda olan çekirdekleri hücrenin ortasına yerleşmiş ve hücre biçimini almıştır. Organelden fakir sitoplazma az miktarda mitochondrion, granüllü endoplazma retikülumu kesesi, veziküller ve granüllere sahiptir. Sitoplazmada lamelli cisimcikler ve değişik büyüklükteki içleri boş vakuoller dikkat çekicidir. Hydrolitik enzimlerden asit fosfataz vakuoller içinde müsbet reaksiyon vermiştir. Tavuk trombocytlerinin kanın pıhtılaşmasının yanı sıra mikroorganizmaları fagosite etme yeteneğinde oldukları in vivo ve in vitro olarak açıkça ortaya konmuştur.*

## SUMMARY

### The Role of Trombocytes in the Cellular Defence Mechanism of Chickens.

*Trombocytes in chickens are oval-round shaped cells with thin pseudopods. Their heterochromatic nuclei are located centrally in the cytoplasm and acquired the cell shape. Organella such as mitochondria, granular endoplasmic reticulum, vesicles and special granules are present in little amount in the cytoplasm. Myelin figures and different size empty vacuols are found predominantly. Acid phosphatase enzyme displayed positif reaction in the empty vacuols. The phagocytic activity of trombocytes in chickens beside their coagualiton activity was clearly determined in vivo and in vitro tests.*

*Key words: Trombocytes, Acide phosphatase, Phagocytosis.*

## GİRİŞ

Perifer kan hücrelerinden trombocyt'ler, aşağı sınıf omurgalılarda ve memelilerde yapılarının farklılığı nedeniyle değişik isimlerle anılmaktadırlar. Aşağı sınıf

\* Doç.Dr.; Uludağ Üniv. Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi, Bursa—TÜRKİYE

omurgalılarından sürüngenlerde, balıklarda ve kuşlarda tipik birer hücre yapısında olan trombocyt'ler, kemik hücrelerinin Stem hücreleri haemocytoblast'lardan köken almaktadırlar. Oval ya da yuvarlak biçimli olan bu hücreler, tam ortada konumlanmış, hücre biçimine uyan şekle sahip çekirdekleriyle ilk bakışta erythrocytlere benzetilebilirler<sup>14.20.23</sup>. Sitoplazmalarında az sayıda granüllü endoplazma retikülumu kesesi ve mitokondrion, birkaç adet spesifik granül, değişik büyüklüklerde içleri boş vakuoller, lamelli cisimcikler vardır. Mikrotubuluslar sitoplazmada bir ağ oluşturmuşlardır, çekirdekleri dens, heterokromatik yapıdadır<sup>14.20.24</sup>.

Memelilerde, ışık mikroskopundaki yapısal görüntülerine bakılarak "Platelet", "Mekik hücreler", "Thygomocyt" ve "Kan pulcukları" gibi isimlerle anılan trombocytler, kemik iliğinde haemocytoblast'lardan köken alan dev hücreler megakaryocyt'lerin sitoplazma parçalarından oluşmaktadırlar. Bir hücrenin sitoplazma parçalarından oluştuğu için çekirdeğe sahip değildir. Ovalden yuvarlağa kadar değişik biçimlere sahiptirler. Sitoplazmalarında ortaya yerleşmiş koyu boyanan bir kitle vardır. Periferde ise mikrotubulus ve mikrofilamentlerin oluşturduğu bir ağ mevcuttur. Ortaya yerleşmiş koyu boyanan kitle (granulomer veya chromomer), daha çok organeller bölgesidir. Bu bölgede serbest ribozomlar, mitokondrionlar, granüllü endoplazma retikülumu tubulusları, Golgi vezikülleri vardır. Organellerden başka, trombocytlerin depo edilmiş sekresyon ürünlerine, vakuollere rastlamak da mümkündür<sup>6.7.12.13.15.16.23</sup>.

Gerek aşığı sınıf omurgalılarda, gerekse memelilerde trombocytlerin önde gelen görevleri kan damarlarında meydana gelen bir yırtılma sonunda, kanın hava ile teması sırasında pıhtılaşmasını sağlamaktır. Bu görevlerini yerine getirirken önce pekçok trombocytin biraraya gelerek topluluklar oluşturdukları, bu toplulukların yardımıyla kanın damar dışına çıkmasını önlemeye çalıştıkları görülür. Daha sonra trombocytlerden salınan bazı enzimlerin perifer kanda mevcut başka enzimlerle reaksiyona girerek kandaki fibrinojeni fibrin haline getirdikleri, bu fibrin taneciklerinin yaptığı yumak (trombus) ile de pıhtılaşmanın sağlandığı gözlenir<sup>7.8.15.16.23.24</sup>. Bazı araştırmacılar ve yazarlar bu hücrelerin görevlerine değinirken, kanı pıhtılaştırma özelliklerinden başka, kan içinde bulunan toz, mikrop gibi yabancı cisimlere yapışıp onları kitle halinde biraraya toplayıp leucocytlerin fagosite etmelerine yardım ettiklerine<sup>15</sup>, ya da sitoplazmalarında bulunan granülleri ve vakuolleri ile fagositoz yaptıklarına inanıldığına<sup>12.23</sup> değinmekte, bazı araştırmacılar ise<sup>9.10.24</sup>, tavuk trombocytleri ile yaptıkları araştırmalarla trombocytlerin perifer kanda yabancı partikülleri, bakterileri, vital boyaları fagosite edebildiklerine değinmektedirler.

Biz çalışmamızda tavuk trombocytlerinin in vivo ve in vitro yollarla bakterilere karşı fagositik aktivitelerinin olup olmadığını, trombocytlerin sitoplazmalarında bulunan oluşumların hidrolitik enzimlerden asit fosfataz içerip içermediğini saptamaya çalıştık.

## MATERYAL VE METOD

Ultrastruktural, histokimyasal çalışmalar, in vivo ve in vitro yolla fagositoz çalışmalarını için olmak üzere 5'erlik gruplar halinde toplam 15 adet tavuk kullanıldı.

Trombocytlerin ince yapılarını gözleyebilmek amacıyla, hayvanların kalbinden punksiyon yoluyla heparinize 6'şar ml. kan alındı. Anderson<sup>1</sup>'un yöntemine göre 1000 devir/dakika santrifugasyonla elde edilen "buffy coat", Karnovsky<sup>18</sup> yöntemine göre glutaraldehid-parafomaldehid tesbit sıvısı ile 60 dakika tesbit edilerek jiletle peletlere ayrıldı. Bu peletler bir gece 0.1 M fosfat tamponunda (Sakkarozlu) bekletildikten sonra % 1.3'lük Ozmik asitte bir saat süre ile ikinci kez tesbit edildiler. Peletler ikinci tesbitten sonra % 1'lik Uranyl asetat solüsyonunda 1 saat bırakıldılar. Dehidratasyon ve parlatmayı takiben Araldit M'de bloğa alındılar. Bu bloklardan elde edilen kesitlere Reynolds<sup>22</sup> yöntemine göre kontrast boyaması uygulandı.

Histokimyasal çalışmalar için yine Anderson<sup>1</sup>'un yöntemine göre elde edilen peletler, Barka ve Anderson<sup>4</sup>'un sodium betaglycerophosphat, Novikoff ve arkadaşlarının<sup>21</sup> cytidin-5-monophosphoric asit (CMP) medyumlarından geçirilerek bloklandılar.

İn vivo fagositoz çalışması yapmak üzere ayrılmış olan hayvanlara kanat venalarından mililitresinde yaklaşık  $10 \times 10^9$  E.coli bulunan kültürden 0.5 ml. verildi. Bu hayvanların kalplerinden 30 ve 60 dakikalık, 6 ve 24 saatlik aralarla punksiyonla alınan kan örneklerinden yukarıda açıklanan yöntemlerle bloklar hazırlandı. İn vitro fagositoz çalışması yapmak üzere, Ayoub ve White<sup>3</sup>'in insan neutrofil granülositleriyle, Chon ve Morse<sup>11</sup>'un peritoneal eksudattaki heterofil granülositlerle yaptıkları çalışmalarda kullandıkları yöntemlerden yararlandı. Tavukların kalbinden punksiyonla alınan heparinize kandan elde edilen leucocytlerle karışık trombocytler 37°C de Hanks solüsyonuyla iki defa yıkandılar ve üçüncü Hanks solüsyonunda süspansiyon haline getirildiler. 37°C de saklanan bir başka tüpte fagositik karışım şu şekilde hazırlandı.

4 ml. trombocyt-leucocyt karışımı.

4 ml. Staphylococcus aureus kültürü (ml. de  $80 \times 10^6$  bakteri).

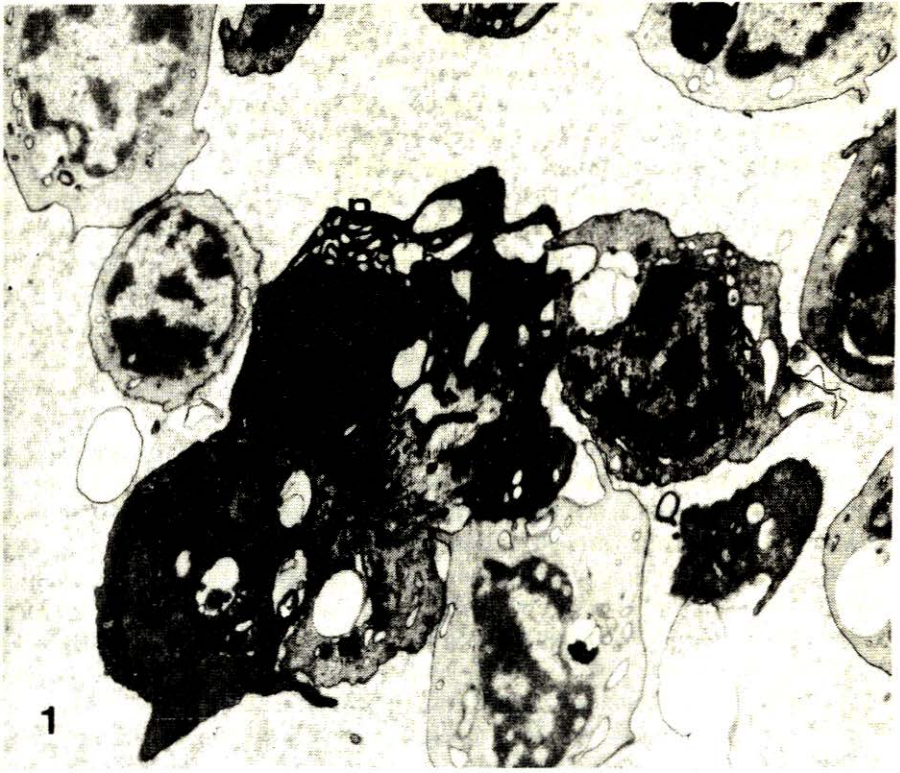
0.5 ml. taze tavuk kan serumu.

37°C'de bir rotatorda yavaş bir şekilde döndürülen bu karışımdan 30, 60, 90'inci dakikalarda alınan örnekler iki misli tesbit solüsyonu ile karıştırılarak 4°C'de tesbit edildiler. Daha sonra % 2 Noble agarla karıştırılarak dondurulan hücreler, % 1.3'lük Ozmik asitte ikinci kez tesbit edildikten sonra Araldit M de bloğa alındılar.

Çalışma süresince hazırlanan bloklardan LKB Ultratome III ile alınan ince kesitler Carl Zeiss EM 9S-2 elektron mikroskobu ile incelendiler.

## BULGULAR

Tavuk perifer kanından yapılan frotiler Giemsa, Wright gibi kan boya ile boyanıp ışık mikroskobunda incelendiğinde trombocytler, oval-yuvarlak biçimli hücreler olarak gözlemlendi. Belirgin sitoplazmaları ile küçük tip lenfositlerden ayrılan bu hücrelerin birçoğu biraraya gelerek gruplar, kümeler yaptıkları görüldü. Hücre biçimini almış ve ortada konumlanmış olan çekirdek, heterokromatik yapıda ve kromatin maddesi çekirdek zarına yakın olarak gözlemlendi. Ayrıca her çekirdeğin belirgin bir çekirdekçiğe sahip olduğu göze çarptı (Resim 1). Trombocyt sitoplazması organel ve inklüzyon yönünden oldukça fakir olarak gözlemlendi. Birkaç adet mito-

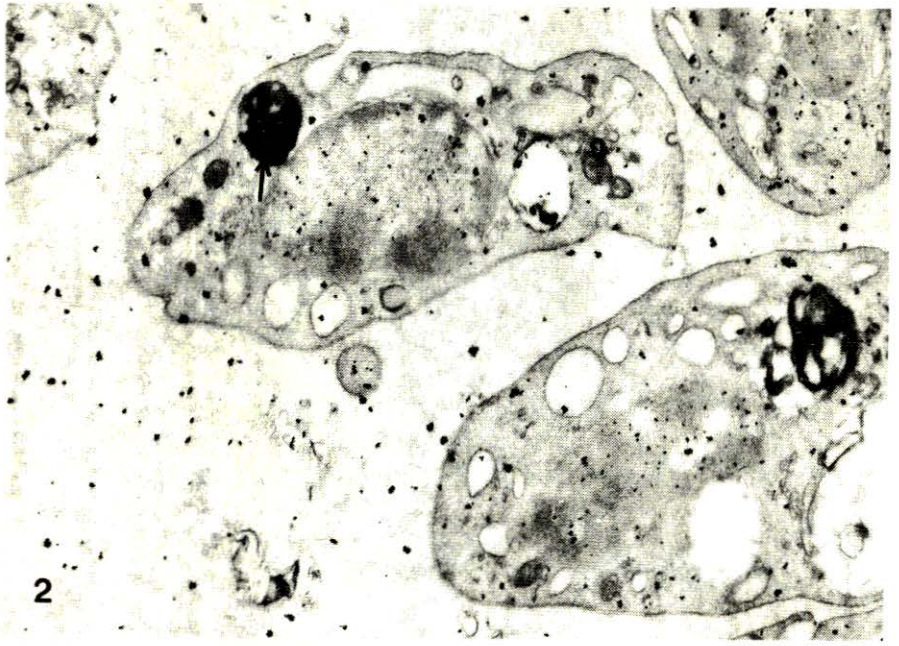


*Resim: 1*  
*Tavuk trombocytleri. Pseudopodlar (P), çekirdekçik (n).x10.000*

kondrion, granüllü endoplazma retikülümü kesesi, mikrotubulusların enine kesitleri, içleri boş vakuoller, küçük veziküller, granüller (Resim 5), lamelli cisimcik (Resim 4) dikkati çektii.

Trombocyt sitoplazmasında asit fosfataz enziminin demonstrasyonu için yapılan preparatların incelenmesinde, enzim aktivasyonu gösteren kurşun presipitatların sitoplazmadaki vakuollere yer yer çöküntüler halinde yerleştiği saptandı (Resim 2,3). Organellerde, küçük veziküllerde ve granüllerde enzim aktivitesine rastlanmadı.

İn vivo fagositozu saptamak amacıyla perifer kanına E.coli kültürü verilen tavuklardan, yarım saat inkübasyondan sonra yapılan kan preparatlarının incelenmesinde, heterophil granüositlerle birlikte trombocytlerin de sitoplazmalarına bakterileri almış oldukları saptandı (Resim 4). İn vitro fagositoz çalışması yapmak üzere taze tavuk kan serumu eşliğinde bir tüp içerisinde birleştirilen, trombocyt-leucocyt karışımı ile Staphylococcus aureus kültüründen 90 dakikalık inkübasyon süresi sonrası yapılan preparatların incelenmesi sırasında, aynen in vivo fagositozda olduğu gibi, sitoplazmadaki vakuoller içerisinde bakterilere rastlandı (Resim 5).



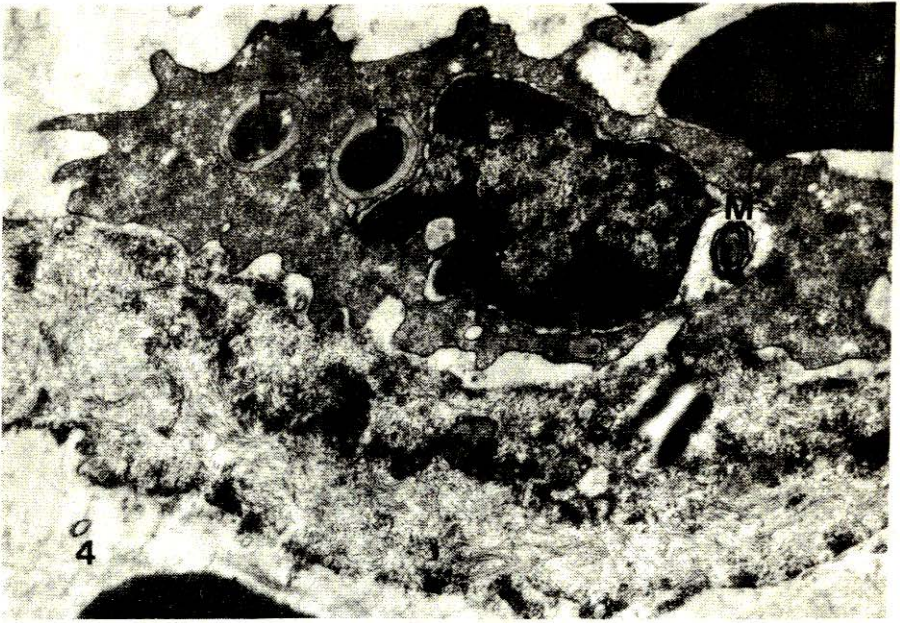
2



3

Resim: 2 - 3

3. Sitoplazmik vakuollerde asit fosfataz demonstrasyonu (Oklar), x26300



Resim: 4

*In vivo fagositoz. Fagositte olan bakteriler (F), lamelli cisimcik (M). x27000*



Resim: 5

*Trombocytlerde in vitro fagositoz. Fagositte olan bakteriler (F), Vakuoller (V)  
Veziküller (Ok), Mitokondrionlar (M), granüllü endoplazma retikülümü  
kesesi (e) mikrotubuluslar (t). x28500*

## TARTIŞMA

Kanatlı kanı ile çalışma yapan araştırmacılar<sup>8.13.14.17.20</sup>, elektron mikroskopta inceledikleri tavuk trombocyt'lerinin çoğunlukla benzer bir biçime sahip olmadıklarını, düzensize yakın bir biçimde gözlendiklerini ancak, çekirdeklerinin ortada yerleşerek hücre biçimine uyduğunu bildirmişlerdir. Trombocytlerin çekirdekleri dens, heterokromatik<sup>8.19.20</sup>, piknotik yapıdadır<sup>8</sup>. DELLMAN ve BROWN<sup>13</sup>, MAXWELL<sup>19</sup>, NIRMALAN ve arkadaşları<sup>20</sup> trombocytlerin birçok pseudopodlara sahip olduklarına değinirken, DHINGRA ve arkadaşları<sup>14</sup> bu hücrelerin pseudopodlara sahip olmadıklarını belirtmişlerdir. Bir kısım araştırmacılar<sup>13.14.19.20</sup> sitoplazmada golgi kompleksinin nadiren görünmesine karşılık, serbest ribozomların, glikojen partiküllerinin, mitokondrionların ve granüllü endoplazma retikülumu keselerinin daha sık rastlandığını belirtmişlerdir. Sitoplazmadaki ipliksel organellerden mikrotubulus ve mikrofilamentlerin varlığı DELLMANN<sup>13</sup>, MAXWELL<sup>19</sup> ve NIRMALAN<sup>20</sup> tarafından ortaya konmuştur. Tavuk trombocytlerinin ince yapılarını gözlemek üzere yaptığımız preparatların incelenmesinde, hücrelerin oval-yuvarlak biçimlerde ve birçok ince pseudopodlara sahip olduklarını saptadık. Hücre biçimine uyan çekirdekler heterokromatik ve belirgin bir çekirdekçiğe sahip olarak gözlendi. Sitoplazmada az miktarda mitokondrion, granüllü endoplazma retikülumu kesesi, granül ve veziküller ile, daha çok miktarda içleri boş, değişik büyüklükte vakuollere rastlandı. Mikrotubulusların sitoplazmanın bir köşesine toplanmış olduklarını saptadık. Lamelli cisimcikler bazı hücrelerde vakuoller içerisinde göze çarptılar.

Memelilerin, tavşanların ve kanatlıların trombocytleri üzerinde inceleme yapan araştırmacılar<sup>5.9.24.25</sup> ve kitaplarında trombocytler üzerinde görüşlerini belirten yazarlar<sup>7.8.12.13.16.23</sup>, trombocytlerin sitoplazmalarında asit fosfataz enziminin varlığını belirtmişlerdir. CONSTANTINIDES<sup>12</sup>, memeli trombocytlerinin sitoplazmasında çok sayıda etrafları membranla çevrili, orta densitede asit fosfataz içeren granüllere rastlandığını belirtirken, BLOOM ve FAWCETT<sup>7</sup>, DELLMANN<sup>13</sup>, HAM ve CORMAC<sup>16</sup> trombocytlerinin ortasındaki chromomer bölgesinde hidrolitik enzimlerin, etrafları membranla çevrili granüller içinde bulduklarını, SAĞLAM<sup>23</sup> bu granüllerin lysosom olarak kabul edildiğini belirtmişlerdir. WETZEL ve arkadaşları<sup>25</sup> tavşan trombocytlerinin küçük dens granüllerinin asit fosfataz aktivitesi gösteren oluşumlar olduğuna değinmiş, BRADLEY<sup>8</sup>, CARLSON ve arkadaşları<sup>9</sup> ve SWEENEY<sup>24</sup> tavuk trombocytlerinin sitoplazmalarında bulunan granüllerde asit fosfataz enziminin varlığına dikkati çekmişlerdir.

Tavuk trombocytlerinin sitoplazmalarında bulunan oluşumların asit fosfataz enzimi içerip içermediğini incelemek amacıyla yaptığımız elektron mikroskopik preparatların incelenmesinde, trombocytlerin sitoplazmalarındaki vakuollerde enzim aktivasyonunu gösteren kurşun presipitatların yer yer çöküntüler yaparak asit fosfataz enzimi yönünden pozitif reaksiyon gösterdiklerini saptamış bulunmaktayız.

Trombocytlerin bugüne kadar bilinen esas görevleri olan kanı pıhtılaştırmaktan başka, yabancı maddelerin fagositozuna ilişkin görevlerinin de olabileceği üzerinde durulmuştur<sup>2.9.10.12.15.23</sup>. BRADLEY<sup>8</sup> kanatlı trombocytlerinin memelilerle aynı görevi yaptıklarını belirtirken ERKOÇAK<sup>15</sup> trombocytlerin kan içinde-

ki yabancı cisimlere yapışarak onları biraraya topladığını ve böylece leucocytlarin fagosite etmelerini sağladıklarını bildirmekte, CONSTANTINIDES<sup>1 2</sup> trombocytlerin pıhtılaştırma görevinden başka, kanda bulunan çeşitli partikülleri absorbe etmeye muktedir olduğuna değinmekte, yabancı partiküllere karşı korunmada rollerinin ne olduğunun henüz aydınlatılmadığını bildirmektedir. SAĞLAM<sup>2 3</sup> trombocytlerin fagositoz da yaptıklarına inanılmakta olduğuna değinmekte CARLSON ve arkadaşları<sup>9</sup> tavuk trombocytlerinde sitoplazmik veziküller içerisinde vital boyaların birikmesi, aynı veziküllerin asit fosfataz aktivitesi göstermesi, tavuk trombocytlerinin fagositik bir hücre olduğunu göstermektedir demektedirler. CHANG ve HAMILTON<sup>1 0</sup> trombocytlerin heterofiller, monositler gibi fagositoza katılan hücreler olduğunu belirtmektedirler. AWADHIYA ve arkadaşları<sup>2</sup> ise, tavuk trombocytlerinin in vivo ve in vitro olarak karbon partiküllerini fagosite etmeye muktedir olduklarına değinmekte, trombocytlerin kanı yabancı materyalden temizlemeye yardımcı olabileceklerini bildirmektedirler.

Tavuk trombocytleri ile yaptığımız in vivo ve in vitro fagositoz çalışmalarında bu hücrelerin, yabancı mikroorganizmalara karşı fagositoz yapabilme yeteneğine sahip olduklarını saptadık.

Pseudopodları, sitoplazmalarında asit fosfataz enzimi içeren vakuelleri, yabancı mikroorganizmalara karşı fagositoz yetenekleri ile kanatlı trombocytleri perifer kanda, esas görevleri hücrel savunma olan heterophyl granülocyt'lerin en büyük yardımcısıdır.

#### KAYNAKLAR

1. ANDERSON, D.R.: A method of preparing peripheral leucocytes for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res, 13: 263-68, (1965).
2. AWADHIYA, R.P., VEGAD, J.L., KOLTE, G.N.: Demonstration of the phagocytic activity of chicken trombocytes using colloidal carbon. Res. in Veterinary Science 29(1): 120-122, (1980).
3. AYOUB, E.M., WHITE, J.G.: Intrapagocytic degradation of group A Streptococci: electron microscopic studies. J. Bact. 98: 728, (1969).
4. BARKA, T., ANDERSON, P.J.: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. J. Histochem. Cytochem., 10: 741-53, (1962).
5. BARKER, M.E.B., BAINTON, D.F.: Identification of Primary Lysosomes in Human Megakaryocytes and Platelets. Blood, Vol. 59, No. 3, (1982).
6. BEVELENDER-G., RAMALEY, J.A.: Essentials of Histology. The C.V. Mosby Company, London (1979).
7. BLOOM, V. and FAWCETT, D.W.: A textbook of Histology. W.B. Saunders Company, Philadelphia (1975).
8. BRADLEY, C.O.: The structure of the fowl. Oliver and Boyd Ltd. Edinburg-Great Britain (1960).
9. CARLSON, H.C., SWEENEY, P.R. and TOKARYK, J.M.: Demonstration of phagocytic and trephocytic activities of chicken trombocytes by microscopy and vital staining techniques. Avian Dis. 12: 700-715, (1968).



10. CHANG, C.F., HAMILTON, P.B.: The trombocyte as the primary circulating phagocyte in chicken. *J. of Reticuloendothelial society* 25(6), 585-590, (1979).
11. COHN, Z.A., MORSE, S.I.: Interactions between rabbit polymorphonuclear leucocytes and staphylococci. *J. Exp. Med.* 110: 419, (1959).
12. CONSTANTINIDES, P.: *Functional Electronic Histology*. Elsevier Sci. Pub. Company, New York (1974).
13. DELLMANN, H.D., BROWN, E.M.: *Textbook of Veterinary Histology*. Lea and Febiger, Philadelphia, (1981).
14. DHINGRA, L.D., PARRISH, W.B. and VENZKE, W.G.: Electron microscopy of nongranular leucocytes and trombocytes of chicken. *Am. J. Vet. Res.*, 30: 1837-1842, (1969 b.)
15. ERKOÇAK, A.: *Genel Histoloji*. A.Ü. Tıp Fak. Yay. Sayı: 364, (1978).
16. HAM, A.W., CORMAC, D.H.: *Histology*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia and Toronto, (1979).
17. HODGES, R.D.: *The Histology of the Fowl*. Academic Press, London, (1974).
18. KARNOVSKY, M.J.: A formaldehyd-glutaraldehyd fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 27: 137A-138A, (1965).
19. MAXWELL, M.H.: An ultrastructural comparison of the mononuclear leucocytes and trombocytes in six species of domestic bird. *J. Anat.* 117: 1.69-80, (1974).
20. NIRMALAN, G.P., ATWAL, O.S. and CARLSON, H.C.: Ultrastructural studies on the leucocytes and trombocytes in the circulating blood of Japanese quail. *Poultry Sci.* 51: 2050-55, (1972).
21. NOVIKOFF, P.M., NOVIKOFF, A.B., QUINTANA, N. and HAUW, J.J.: Golgi apparatus, GERL and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia studied by thick section and thin section cytochemistry. *J. Cell. Biol.* 50: 859-86, (1971).
22. REYNOLDS, E.S.: The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17: 208-212, (1963).
23. SAĞLAM, M.: *Genel Histoloji*. Ogun Kardeşler Matbaacılık Sanayii, Ankara, (1984).
24. SWEENEY, P.R. and CARLSON, H.C.: Electron microscopy and histochemical demonstration of lysosomal structure in chicken trombocytes. *Avian Dis.* 12: 636-644, (1968).
25. WETZEL, B.K., SPICER, S.S., HORN, R.G.: Fine structural localization of acid and alkaline phosphatase in cells of rabbit blood and bone marrow. *J. Histochem. Cytochem.* 15: 311-334, (1967).